

カエルの臓器および筋肉の呼吸に関する実験

塩 浦 寅 夫^{*}

自作の簡易検容計により、カエルの臓器および筋肉組織の呼吸量を測定し、その結果をワールブルグ検圧計で比較検討している。また、ウシガエルの神経脚標本を用いて、筋肉の収縮運動にともなう呼吸量の変化、発熱現象、さらに、グリコーゲンの減少を実験的に確かめ、実験上の問題点もふくめて検討している。

この研究は中学校第二分野「動物の物質交代」および「生活活動のエネルギー」における教材の基礎資料を得ることをねらったものである。

1 はじめに

中学校第二分野「生活活動のエネルギー」の学習では、「生物は、生活活動のエネルギーを、呼吸によって得ている」¹⁾ことを理解させることがねらいの1つとなっている。ここでは、生命現象を組織や細胞レベルの問題として取り上げることが要求されているが、適切な実験や資料が提示できない困難点がある。

従来、中学校の素材研究として、植物材料や小動物を使った呼吸の実験報告が多い。筆者は、身近なカエルを使って、その臓器や腓腸筋の呼吸に関する実験を検討した。

カエルの筋収縮にともなう乳酸発生や発熱に関する A. V. Hill, Meyerhof²⁾の研究以来、筋収縮における ATP のはたらきも明らかにされている。ここでは、素材研究の観点から、呼吸の基礎的な実験として、

- ・臓器、筋肉の呼吸現象を B T B 溶液による呈色反応と自作検容計によって検討。
- ・腓腸筋の運動にともなう呼吸量の変化。
- ・筋肉の仕事量と発熱量の関係。
- ・腓腸筋の収縮運動とグリコーゲンの減少。

をとりあげ、若干の結果を得たので報告する。

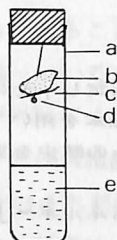
2 カエルの臓器と筋肉の呼吸

実験1 B. T. B. 水溶液による呈色反応

方法：B. T. B. (Bromothymol Blue) 水溶液は、pH 7.6(青)～6.0(黄)で、呈色範囲が狭い利点を生かせる。0.1%水溶液を蒸留水100ml中に数滴加え、炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、中性にしたものを使用する。ウシガエルの脳と脊髄をピスしたのち、ただちに臓器と筋肉を切りとり、B. T. B. 溶液10ml入れた管びんに入れて図1のようにセットし、恒温水槽を80℃に保つ。

* 理科長期研修員（長岡地区理科教育センター，長岡市立南中学校）

ヒトの呼気および炭酸水素ナトリウム溶液によってBTB標準比色液を表1のように7段階用意する。組織呼吸によって放出された二酸化炭素が水にとけて H^+ を生じ、弱酸性になる程度をこの比色液と比較してきめる。pH測定にはpHメーターHITACHI-HORIBA M-4型を使用した。



(図1) B. T. Bの呈色反応
a ; 管びん b ; 組織 c ; ろ紙
d ; まち針 e ; B. T. B溶液

(表1) B. T. B標準比色液

比色段階	1	2	3	4	5	6	7
色調	青	青緑	緑	黄緑	緑黄	緑黄	黄
pH値	7.4	7.2	7.1	7.0	6.9	6.7	6.4

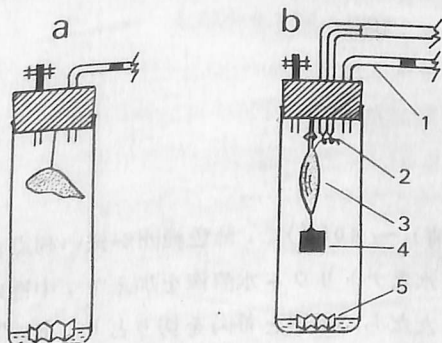
(表2) 各臓器の呈色段階(1~6)

組 織	Cont.	小腸	腎臓	胃	肝1	肝2	筋1	筋2
生体重g	—	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
経 過								
30分	1	1	2	1	2	1	2	1
60分	1	3	3	2	3	2	3	2
90分	1	4	5	3	5	5	4	3
120分	1	6	6	4	6	6	5	4
pH値	7.4	6.8	6.9	7.1	6.8	6.8	7.0	7.1

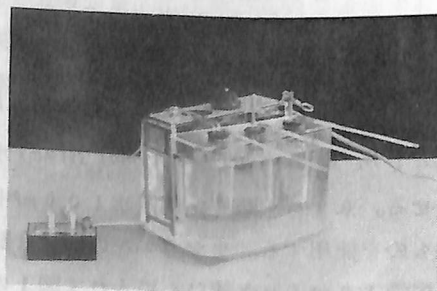
結果と考察：およそ30分経過後B. T. B溶液の変色が認められ、時間経過と変色段階について(表2)の結果を得た。筋肉、胃と他の臓器の間には呼吸の進行程度に相違がみられ、pH測定値においても有意差が認められる。ただし、組織の表面積や標本調整が同じとは限らないので、組織別の呼吸量差については、検圧計によって検討する必要がある。しかし、組織呼吸を視覚的にとらえるのには有効な実験法と考えられる。

実験2 簡易検容計による呼吸量の測定

実験方法：植物や小動物における呼吸の測定装置は、従来から多種にわたって工夫改良されているが³⁾目的に応じて容易に自作できる簡易検容計を、塩化ビニール管で製作した。(図2)のa型は臓器や筋肉組織の呼吸を、b型は筋肉の収縮運動にともなう呼吸量の変化を測定する目的で製作した。いま、恒温水槽の水温を30℃にし、温度平衡に達したのち、閉塞液の移動から組織の酸素消費量を求めることができる。つまり、呼吸材料としてグリコーゲンが使われ、消費されると考えられるので、呼吸商(CO_2/O_2)=1となる。したがって、20%水酸化カリウム溶液で CO_2 が吸収されているので、



(図2) 簡易検容計
①検容計 ②刺激電極 ③腓腸筋
④荷重 ⑤KOH溶液、ろ紙



(図3) 組織の呼吸測定

閉塞液の移動分がそのまま酸素消費量となる。

（図 8）のようにセットしたのち，トノサマガエル腓腸筋 1.2 g の酸素消費量を測定し（図 4）の結果を得た。測定開始後 15 分ほど検容計の閉塞液が不安定なのは，恒温水槽と呼吸室の温度平衡に達するまでに時間差があることを意味する。

対照による補正值の直線部分から，生体 1 g 1 時間あたりの酸素消費量 Q_{O_2} （呼吸率）を求めることができる。

検容計 1 目盛の容積を水銀を使って測定した結果， $1.1 \mu\text{l}$ であるので

$$Q_{O_2} = 1.1 \ell / m \cdot t \quad (\mu\text{l} / g \cdot h)$$

となる。ただし， ℓ ：閉塞液の移動距離（mm） m ：材料重（生体 g） t ：測定時間（時）

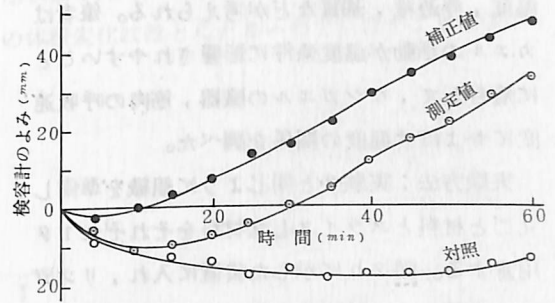
図 4 から Q_{O_2} を求めると， $52.8 \mu\text{l} / g \cdot h$ となる。この測定値を検定するために，ワールブル検圧計を使って，同じ条件にした腓腸筋の Q_{O_2} を測定し 47.5 を得た。内直筋や肝臓についても測定を行ない比較検討した結果，オーダーに隔たりがないので，簡易検容計は使用に耐えるものと考えられる。

なお，イヌの骨格筋は $Q_{O_2} 240$ と報告されており⁴⁾，ここでの測定値が低いのは材料をスライスしないで，まるごと使っているためと考えられる。酸素が組織細胞に充分拡散していくための‘限界の厚み’はガス腔が空気の場合 0.21 mm 以下といわれている。⁵⁾しかし教材化の観点から，限界の厚みを作り出すことが技術上困難なのでスライスしない状態で測定した。

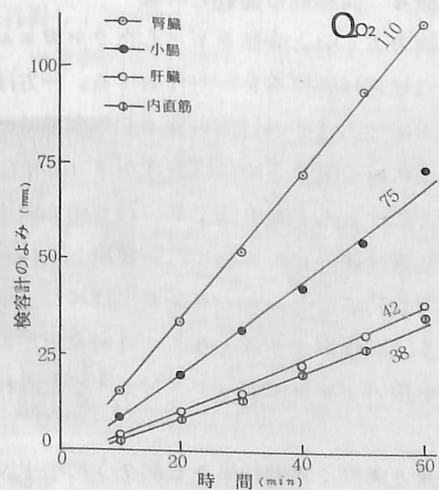
簡易検容計の使用に際しては，閉塞液の安定をはかるためにサーモボックス M-4 型を使用し，対照を確実に設定した。

臓器別呼吸量の測定結果：ウシガエルを解体し，ただちに内臓および内直筋 1 g を切り取る。カエル用リンガーに浸したのち 28°C でその呼吸量を測定した結果，（図 5）を得た。

それぞれの Q_{O_2} をグラフの勾配から求めると，腎臓が 110，内直筋が 38 で約 $1/3$ の値である。また， 36°C では腎臓 207，小腸 105，肝臓 96，腓腸筋 88 を得たが，筋肉の値が小さいのは B. T. B. の呈色反応の結果とも一致している。腎臓の Q_{O_2} が大きいことは代謝作用が活発なことを意味しよう。



（図 4）検容計による筋肉の呼吸の測定



（図 5）ウシガエルの臓器，筋肉の呼吸
（生体重 1 g 温度 28°C ）

実験3 カエルの組織呼吸と温度

呼吸速度に及ぼす基本的な要因にはpH変化、温度、浮遊液、基質などが考えられる。筆者はカエルの活動が温度条件に影響されやすいことに着目して、ウシガエルの臓器、筋肉の呼吸速度におよぼす温度の関係を調べた。

実験方法：実験2と同じように組織を準備し、丸ごと材料とスライスした材料をそれぞれ1g用意する。図2bに示した装置に入れ、リンガー液に浸して、低温から順に11℃、16℃、22℃、27℃、32℃、37℃について40分間測定し呼吸速度のグラフから Q_{O_2} を算出した。

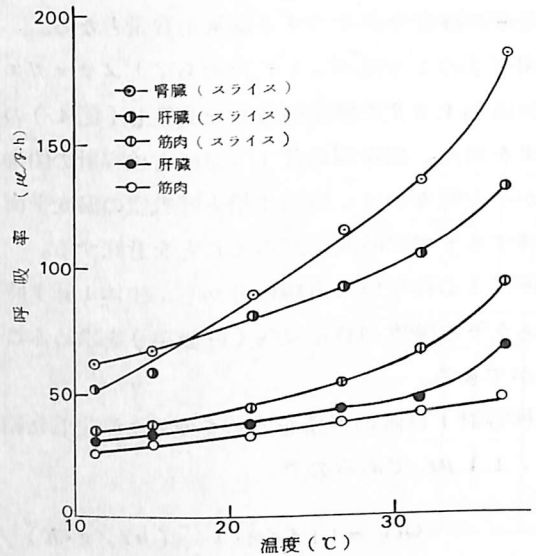
結果と考察：高温になるほど Q_{O_2} は大きくなっている。スライスしない組織ではほぼ直線的な増加傾向を示すが、スライスした組織では高温になるほど呼吸率の増大が目立つ。12℃と37℃での測定値を比較すると、筋肉2.5倍、肝臓2.1倍、腎臓3.3倍の増加となっている。これは至適温度に近づいた結果、酵素の活性が高まったためと考えられる。また、スライスした組織の Q_{O_2} が大きいのは、外気にふれる組織細胞面積が大きくなること、および殺傷による局所興奮のための内存呼吸の増大に起因している。⁶⁾

3 筋肉の収縮にともなう現象

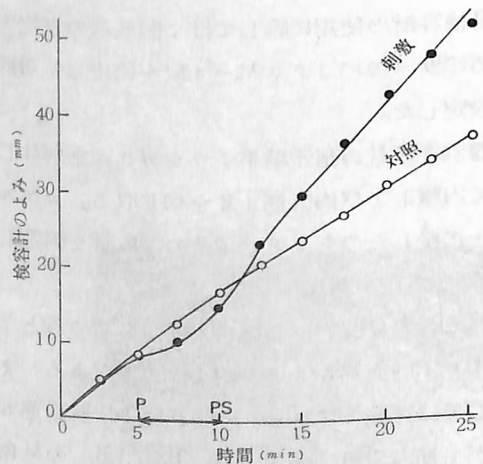
実験4 腓腸筋の運動と呼吸

実験方法：脳と脊髄をビスしたウシガエルを用いて坐骨神経脚標本を一对作製する。一方は収縮運動用に他方はその対照とする。筋収縮時の呼吸量測定には(図2)の検容計にニクロム電極を刺激用として封入した(図2b)のものを使用した。⁷⁾刺激装置は連続パルス発生器を使用し、仕様の電圧と刺激間隔をとった。なお恒温槽には、筋収縮のようすが観察できるように、透明な角形ガラス水槽を用い、サーモボックスM-4型を入れて使った。

結果と考察：実験結果を(図7)に示す。一对の腓腸筋において最初ほぼ同じ呼吸速度を示しているが、5分後、一方を刺激して収縮運動を



(図6) 温度とカエルの組織の呼吸



(図7) 筋収縮にともなう呼吸量の変化

生体重1.3g, 温度25℃

刺激電圧4V, パルス間隔毎秒1.5回

おこなわせると、閉塞液の移動がにぶってくる。しかし、パルス発信をやめ筋収縮運動が停止する頃より呼吸速度を増し、対照筋を上回ってくる。グラフの直線部分からそれぞれの Q_{O_2} を求めると、刺激筋78, 対照筋38となりほぼ2倍の値を得た。つぎに、筋収縮の開始にともない一時的に閉塞液の動きが低下する原因について検討した。筋収縮によって筋肉の体積変化はほとんどないので、次のように考えられる。つまり、筋肉の収縮にともなって発生する熱のための一時的な空気の体積膨張によるか、嫌氣的呼吸の促進により、好氣的呼吸が低下したのかである。そこで、 CO_2 吸収剤(KOH)を呼吸室に入れないで検容計の閉塞液を観察した結果、(図8)を得た。aの移動とbがほぼ一致しているのは、ともに恒温槽の温度変化の影響を受けているとともに、筋肉の呼吸商 $CO_2/O_2=1$ を意味している。

筋収縮をおこなったcについては、収縮運動の開始とともに閉塞液はおし出され、徐々に元の位置にもどってくる。このことは、温度平衡にたつて安定したためと考えられよう。したがって、(図7)のP-P S間の閉塞液の動きは、筋の収縮運動にもなり発熱による呼吸室の体積膨張と考えられる。

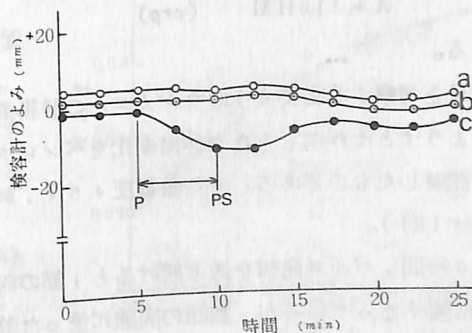
(図7)のごとく、一対の腓腸筋において、筋収縮による呼吸率の増大を確認できることは、呼吸によって得られたエネルギーの変遷を理解する学習に有効であろう。

実験5 筋肉の収縮運動にともなう発熱

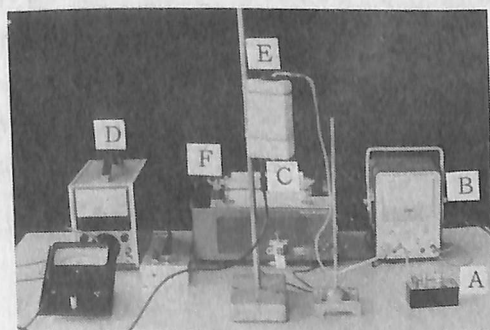
実験方法：ウシガエルの神経脚標本を実験4と同じように作製し、しばらくカエル用リンガー中に静置しておく。つぎに、この筋肉の下端に9.4gの荷重をかけ、坐骨神経を刺激電極に接続したのち、容積130mlの発泡スチロール中に封入する。

刺激装置は単パルス発信器を使い、任意の電圧とパルス間隔をとる。体温の記録には、サーミスター温度計(TOKYO DENKISEIKI TSE-1B型)を使用し、真空管電圧計に接続してペンレコーダーで記録させた。なお、レコーダーの記録を温度変化に更正するため、サーミスターの特性曲線を作製して体温変化を換算して求めた。

筋の機械的仕事の求め方：多用途振動計(NIPPON SOKKI EMIC508-A型)を用い、筋収縮のようすを差動変圧器の電圧変化によってペンレコーダーに記録させる。



(図8) KOHを入れない場合の閉塞液の動き
a: 対照 b: 対照筋 c: 収縮筋
P: 筋収縮開始 PS: 同ストップ



(図9) 筋肉の発熱測定装置
A: パルス発信器 B: 振動計 C: サーミスター
D: 真空管電圧計 E: 筋刺激部 F: 記録計

筋の機械的仕事量 A は、筋収縮による荷重の上下動を H 、
筋にかかる荷重を G 、腓腸筋の重さを m とすれば、

$$A = \Sigma H \left(G + \frac{m}{2} \right)$$

となる。ここで、 $G = 9.4 \text{ g}$ 、 $m = 4.3 \text{ g}$ であるから、
 $(G + m/2) \div 11.6$ となり、 H は収縮運動の記録から \bar{H} とし
て算出することができる。したがって、収縮回数を M とする
ならば

$$A = 11.6HM \quad (\text{erg})$$

となる。

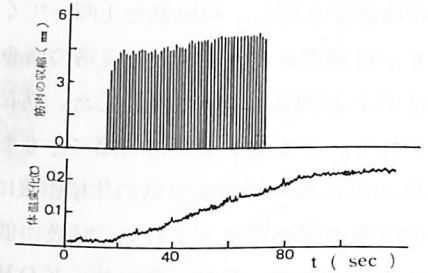
結果と考察：(図10)はウシガエルの腓腸筋の収縮のようすとそれにともなう体温変化をペンレコーダーで記録したものである。(刺激電圧 4.5 V、刺激間隔毎秒1回)。

60秒間、パルス発信を送り続けると、筋の収縮は徐々に強くなっているが、数回の実験に使った筋では逆に弱くなってくる。これは筋の鮮度や疲労度に関係してくる。(図10)にみられるように、筋収縮につれ、比例して体温の上昇が記録され、刺激を中止してからしばらく上昇をつづける。1回のれん縮で、張力が発生する前に活動化熱が生じ、ついで収縮熱がおけるといわれている。ここで測定している発熱量は活動化熱と収縮熱を加算していることになる。

筋肉の仕事量と体温上昇の関係を測定した結果(表3)を得た。仕事量 $1.34 \times 10^5 \text{ erg}$ では $0.03 \sim 0.04^\circ\text{C}$ の体温上昇であるが、約2倍の $2.68 \times 10^5 \text{ erg}$ に対して 0.19°C を記録した。両者には指数関数的な関係があると思われたので、(図11)のように片対数目盛でグラフ化した。値にばらつきがあるが、筋肉の収縮にともなう仕事量を $X \text{ (ery)}$ 体温上昇を $Y \text{ (}^\circ\text{C)}$ とすれば、およそつぎの関係式が得られる。

$$Y = 0.007 \times 10^{0.6 \times 10^{-5} X}$$

ただし、筋肉の仕事量が $2.68 \times 10^5 \text{ ery}$ 以内での測定値であるので、この関係式の適用限界があると思われるが、この点を明らかにすることはできなかった。

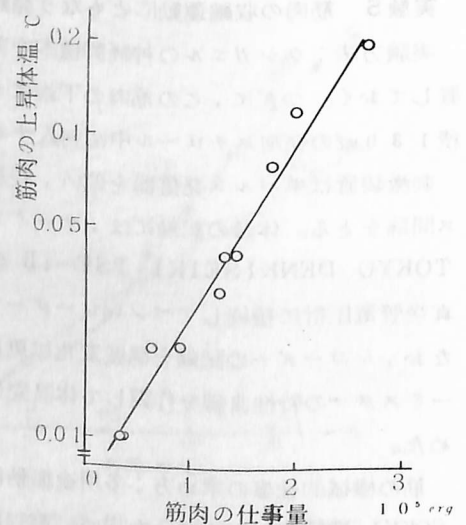


(図10) 筋収縮と体温変化の記録

(表3) 腓腸筋の収縮運動と発熱量

No	運動記録			発熱 上昇体温 $^\circ\text{C}$
	収縮mm	収縮回数	仕事量erg	
1	6.6	35	2.68×10^5	0.19
2	3.5	33	1.34	0.03
3	4.1	30	1.43	0.04
4	3.5	15	0.61	0.02
5	2.1	39	0.95	0.02
6	1.4	22	0.36	0.01
7	2.1	16	0.39	0.01
8	5.5	30	1.91	0.12
9	4.7	25	1.36	0.04
10	5.5	27	1.72	0.08

(腓腸筋 4.2 g 室温 11.3°C)



(図11) 腓腸筋の仕事量と体温の上昇

実験6 筋肉の収縮運動とグリコーゲンの減少

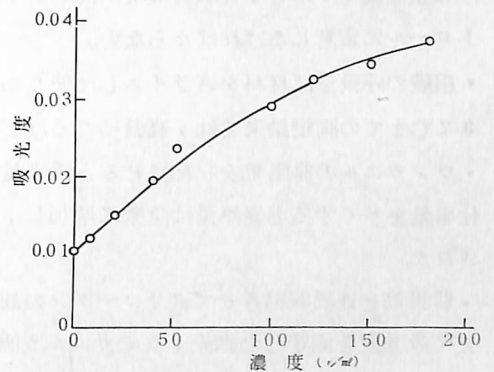
実験方法：実験4と同じようにしてウシガエルの神経脚標本を作製し、その腓腸筋を使用した。

連続刺激装置によって筋肉を連続的に収縮運動をおこなわせ、疲労によって収縮活動が中止した時点までの仕事量を算出した。

グリコーゲンの抽出は、腓腸筋を10%トリクロル酢酸でホモジナイズし、内容物を600Gで遠心分離したのち、上澄みを95%エタノールで600Gにて4回遠心分離する。最後にエーテルを加えて空気中で乾燥して精製グリコーゲンを得た。

得られたグリコーゲンは非常に微量であるため、塩酸によって加水分解し、グルコースのかたちで定量した。定量には、亜酸化銅がヒモブリン酸と反応して発色することを利用したNelson法⁹⁾を使い、530mμにおける吸光度を測定した。

なお、吸光度とグルコース量の関係をみるために、特級グルコース5r/ml～200r/ml用意し、530mμにおける吸光度を測定して標準曲線を作成した結果（図12）を得た。対照には蒸留水を使った。



（図12）グルコース標準曲線

結果と考察：ウシガエル腓腸筋の生成グルコース量は、生体1g当たり218～1041rとなり、個体によって大差がある。これは、9月に入手して冬眠状態で飼育したものを12月に実験したことによると考えられ、採取直後の筋肉では、この値を大幅に上まわると推察される。

なお、No5の肝臓のグルコース量が、対照の筋肉に対して約7倍あることに注目したい。

5個体の腓腸筋中、収縮筋のグリコーゲン（グルコース）減少が確認できたのは、4個体であるが、その減少量はNo1.80%、No2.11%、No4.82%、（No5は不明）となる。

筋肉が収縮運動をおこなって、エネルギー発生の源となるグリコーゲンが使われたことになる。さらにグルコースからビルビン酸を経由し、NADH₂により還元されて、乳酸を蓄積したものと考えられるが、乳酸の定量は出来なかったので今後の課題としたい。

（表4）筋収縮にともなうグルコースの減少

個体 No	P C	仕事量 joule	生体重 g	グルコース 吸光度	グルコース r/ml	グルコース r/生体g
1	P	0.028	3.7	0.014	375	101
	C		3.8	0.027	1900	500
2	P	0.015	4.9	0.036	4050	827
	C		4.8	※0.029	4450	927
3	P	0.010	3.7	0.023	1350	365
	C		3.7	0.023	1350	365
4	P	0.023	3.0	0.016	550	183
	C		3.0	0.033	3125	1041
5	P	0.014	3.1	0.008	(—)	(—)
	C		3.1	0.017	675	218
	肝臓		5.0	※0.032	7250	1450

※印は200r/ml以上のため希釈して求めた値

Pは刺激による運動筋、Cはその対照

(—)は吸光度が一を示し、測定不可能なもの

4 ま と め

以上, カエルの臓器および筋肉の呼吸と, 筋収縮にともなういくつかの現象をとらえる実験について検討してきたが, 簡単にまとめるとつぎのようになる。

- ・カエル組織の呼吸現象を定性的にとらえるには, B. T. B 溶液による呈色反応を利用すると有効である。
- ・簡易検容計によって組織の呼吸量を測定することが可能であり, 自作も容易である。カエルの臓器の呼吸量を測定すると, 腎臓の Q_{O_2} が高いが, 測定に際しては, 確実に対照を設定することと温度のコントロールに留意しなければならない。
- ・組織の呼吸量は材料をスライスして使うか否かで異なってくる。また, 温度条件によって左右され, 37°C までの測定結果では, 高温になるほど Q_{O_2} が高く, 酵素活性が高まることが考えられる。
- ・ウシガエルの腓腸筋を収縮させると呼吸量は増加し, およそ 2 倍の Q_{O_2} が確認できた。また, 筋肉の仕事量を多くすると発熱量は急激に増加し, 2.68×10^{-2} ジュールに対して約 0.2°C の体温上昇が測定された。
- ・腓腸筋を連続収縮させてグリコーゲンの減少を認めることができた。グリコーゲンをグルコースに変えて吸光度を測定した結果, ウシガエル 5 個体中 4 個体に差を認めた。

以上の基礎資料を用い中学校「動物の物質交代」への教材化をはかるには, 実験の位置づけ, 材料処理のしかた, さらに測定技術的な問題などの検討が必要である。また, 筋肉の呼吸量およびグリコーゲンの減少を調べる実験では定性的な扱いしかできなかった。今後, 実験法の改良とともに, その定量化をめざして研究を深めていきたい。

文 献

- 1) 文部省: 中学校指導書, 理科編 (1970) P162
- 2) 丸山工作: 生体とエネルギー, 岩波書店 (1966) P139
- 3) 篠原尚文: 呼吸領域の取扱い 1, 科学の実験 vol. 23, No. 5 (1972) P93
- 4) 三輪知雄ほか: 生命現象の研究 (高校生物指導資料), 三省堂 (1966) P117
- 5) 吉川春寿ほか編: ワールブルグ検圧計, 南江堂 (1954) P114
- 6) 関根隆光ほか: 続ワールブルグ検圧計, 南江堂 (1955) P175
- 7) 広野樹: 理科教育センター研究集録第5集 (1967) PP41-42
- 8) 本川弘一ほか: 最新一般生理学, 朝倉書店 (1956) P303
- 9) N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944)